

Aus dem Biochemischen Institut
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Hj. Staudinger

**Semidehydroisoascorbinsäure als Substrat der
mikrosomalen NADH: Semidehydroascorbat-
Oxydoreduktase (EC 1.6.5.4) der Rattenleber**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Gerd Oehler
aus Alsfeld

Gießen 1970

Aus dem Biochemischen Institut
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Hj. Staudinger

**Semidehydroisoascorbinsäure als Substrat der
mikrosomalen NADH: Semidehydroascorbat-
Oxydoreduktase (EC 1.6.5.4) der Rattenleber**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Gerd Oehler
aus Alsfeld

Gießen 1970



Dekan: Professor Dr. E. Habermann

Referent: Professor Dr. Hj. Staudinger

Korreferent: Professor Dr. M. Frimmer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Verwendete Chemikalien	4
2.2.	Mikrosomenpräparation	5
2.3.	Mitochondrienpräparation	6
2.4.	Herstellung eines Aufschlusses von Mikrosomen mit dem Detergens Eumulgin 286 ^R	6
2.5.	Proteinbestimmungen	6
2.6.	Meßmethodik	6
2.7.	Bestimmung der Reaktionsprodukte	8
2.7.1.	Bestimmung des NAD^+	8
2.7.2.	Bestimmung von i-AsH_2	9
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Enzymkinetik	12
3.1.1.	Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH	12
3.1.2.	Proteinabhängigkeit der Enzymaktivität	13
3.1.3.	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur	14
3.1.4.	Ermittlung der scheinbaren Michaelis-Konstanten	15
3.1.5.	Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Verhältnis i-AsH_2 : i-As	17
3.2.	Nachweis der Reaktionsprodukte	20
3.2.1.	Bestimmung der entstandenen i-AsH_2	20
3.2.2.	Nachweis des entstandenen NAD^+	22
3.3.	Beeinflussung der Reaktion durch Zusätze	23
3.3.1.	Wirkung von Inhibitoren	24
3.3.2.	Wirkung von Metallionen	25
3.3.3.	Wirkung von NAD^+	27
3.3.4.	Begasung des Ansatzes mit Kohlenmonoxyd	29
3.3.5.	Verwendung gewaschener Mikrosomen	29
3.4.	Aus verschiedenen Kombinationen gebildete Komproportionierungsgemische	30

3.4.1.	Vergleich der Aktivitäten der vier Kombinationen im Komproportionierungsgemisch für eine konstante Radikalkonzentration	31
3.4.2.	Ermittlung der Michaelis-Konstanten für die vier Kombinationen im Komproportionierungsgemisch	32
3.4.3.	Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Verhältnis $AsH_2 : i-As$ bzw. $i-AsH_2 : As$	34
3.5.	Das mitochondriale Enzym	36
3.6.	Reduktion durch $NADPH_2$	37
4.	Diskussion	38
5.	Zusammenfassung	42
6.	Literatur	43

Abkürzungen:

$i-AsH_2$ = D(-)-Ascorbinsäure = iso-Ascorbinsäure = D(-)-Arabo-ascorbinsäure; $i-As$ = Dehydro-D(-)-ascorbinsäure = iso-Dehydroascorbinsäure = Dehydro-D(-)-araboascorbinsäure; $i-AsH^*$ = Semidehydro-D(-)-ascorbinsäure = Semidehydroiso-ascorbinsäure = Semidehydro-D(-)-araboascorbinsäure. AsH_2 , As , AsH^* sind die Abkürzungen der entsprechenden Oxydationsstufen der L(+)-Ascorbinsäure. $NADH$ = reduziertes Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid; NAD^+ = oxydiertes Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid. DCPIP = 2,6-Dichlorphenol-indophenol-Natrium. ADH = Alkoholdehydrogenase. Tris = Trishydroxymethylaminomethan. PCMB = Para-chlor-mercuri-benzoat.

1. Einleitung

Der Vitamincharakter der L(+)-Ascorbinsäure für den Menschen und einige Säugetiere ist lange bekannt. HOLST und FRÖHLICH (1) bewiesen im Jahre 1907, daß sich die Symptome des Skorbutus beim Meerschweinchen experimentell durch Vitamin-C-Mangel hervorrufen lassen. 1933 gelang die Aufklärung der chemischen Struktur der L(+)-Ascorbinsäure (2 - 6), die auch durch die Synthese bestätigt werden konnte (7 - 9).

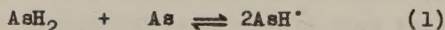
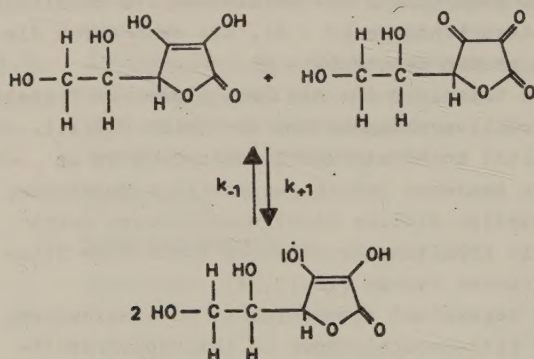
In der Medizin wird Vitamin C für die Prophylaxe und Therapie insbesondere der Erkältungskrankheiten empfohlen (10,11).

Über den Effekt selbst hochdosierter Vitamin-C-Gaben in diesen Indikationen bestehen jedoch gegenteilige Meinungen, zumal in experimentellen Studien nicht nachgewiesen werden konnte, daß sich die Erkältungskrankheiten durch hohe Vitamin-C-Dosen beeinflussen lassen (12,13,14).

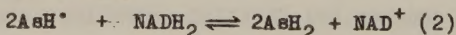
Es ist seit langem Gegenstand biochemischer Untersuchungen, die Funktionen der L(+)-Ascorbinsäure im Intermediärstoffwechsel aufzuklären. Wenn auch einige Probleme, wie etwa die Biosynthese des Vitamins als weitgehend gelöst angesehen werden können, so ist doch trotz vieler Bemühungen vor allem die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der L(+)-Ascorbinsäure noch offen. Eine zusammenfassende Übersicht über den heutigen Stand der Ascorbinsäureforschung aus biochemischer Sicht findet sich unter anderem bei DEGWITZ, SCHNEIDER und STAUDINGER (15, siehe auch 16,17,18).

In früheren Arbeiten wurde von STAUDINGER et al. (19,20,21) ein in den Mikrosomen und Mitochondrien einiger Säugetierorgane vorkommendes Enzymsystem beschrieben, das den Elektronenübergang von NADH auf ein radikalartiges Oxydationsprodukt der L(+)-Ascorbinsäure katalysiert. Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie konnte das Acceptor-Radikal als die Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure identifiziert werden (22,23), die unter anderem bei der Oxydation der L(+)-Ascorbinsäure durch die pflanzliche Ascorbat- O_2 -Oxydoreduktase (EC 1.10.3.3) entsteht.

Später konnte gezeigt werden, daß das Radikal auch auf nicht-enzymatischem Wege nach Art einer Komproportionierungsreaktion aus L(+)-Ascorbinsäure und Dehydro-L(+)-ascorbinsäure entsteht (22,23,24,25,26):



Das bei diesem ersten Schritt entstehende Produkt wird dann in Anwesenheit von NADH als Elektronendonator durch das Enzymsystem reduziert:



Nachdem es gelungen war, auf ESR-spektroskopischem Wege die Gleichgewichtskonstante K für die Reaktion (1) zu ermitteln (25), konnte mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes die Radikalkonzentration $\text{AsH}^{\bullet}$ errechnet werden:

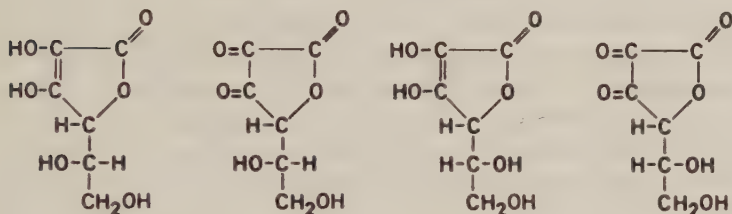
$$\frac{[\text{AsH}^{\bullet}]^2}{[\text{AsH}_2] \cdot [\text{As}]} = K \quad (3)$$

$$[\text{AsH}^{\bullet}] = \sqrt{K \cdot [\text{AsH}_2] \cdot [\text{As}]} \quad (3a)$$

Mit diesen Voraussetzungen war es möglich, die Kinetik der NADH:Semidehydroascorbinsäure-Oxydoreduktase (EC 1.6.5.4) unter den Bedingungen der Radikalerzeugung über die Komproportionierungsreaktion zu untersuchen. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit der mikrosomalen NADH:Semidehydroascorbinsäure-Oxydoreduktase wurde von LUMPER, SCHNEIDER und

STAUDINGER (27) berichtet. Von NAZEMI und STAUDINGER (28,29) wurden die kinetischen Daten des aus der Mitochondrienfraktion gewonnenen Enzyms publiziert.

Um nähere Aussagen über die Stereospezifität des Enzyms machen zu können, eignet sich besonders die Verwendung der Semidehydro-D(-)-ascorbinsäure. Diese entsteht ebenfalls in einer Komproportionierungsreaktion aus D(-)-Ascorbinsäure und Dehydro-D(-)-ascorbinsäure. Dabei handelt es sich um Diastereomere zur L(+)-Ascorbinsäure bzw. Dehydro-L(+)-ascorbinsäure, wie aus der folgenden Gegenüberstellung der Strukturformeln ersichtlich ist.



L(+)-Ascorbin- säure	Dehydro-L(+)- ascorbinsäure	D(-)-Ascorbin- säure	Dehydro-D(-)- ascorbinsäure
-------------------------	--------------------------------	-------------------------	--------------------------------

Auch in den schon erwähnten Untersuchungen von STAUDINGER und Mitarb. (20) war im Zusammenhang mit der Frage nach der Stereospezifität des Enzyms die i-AsH₂ als Substrat verwendet worden. Unter den damaligen Bedingungen wurde eine niedrigere Enzymaktivität für i-AsH₂ als für AsH₂ gefunden. Dieser Aktivitätsunterschied könnte auch darauf zurückzuführen sein, daß die bei den damaligen Versuchen mit der pflanzlichen Ascorbinsäureoxydase erzeugte Radikalkonzentration bei der i-AsH₂ niedriger als bei AsH₂ war. In diesem Fall wäre die Stereospezifität der Oxydase, nicht aber die der NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase für den Befund verantwortlich gewesen.

Deshalb ist in der vorliegenden Arbeit das Enzymsystem nochmals auf seine Substratspezifität hin untersucht worden, indem

die neueren Erkenntnisse der Radikalerzeugung über eine Komproportionierungsreaktion - analog der für die AsH_2 dargestellten Weise - auch für die i-AsH_2 angewandt wurden.

Voraussetzung für die Erzeugung von $\text{i-AsH}^\bullet$ mit Hilfe der Komproportionierungsreaktion war das Vorhandensein der i-As , die bis dahin als gereinigte Substanz nicht vorlag. Die Synthese des Stoffes wurde in unserem Institut durchgeführt.^{+) Weiterhin wurde mit den Methoden der ESR-Spektroskopie nachgewiesen, daß sich auch für die Reaktion}



die gleiche Gleichgewichtskonstante K ergibt wie für die entsprechende Reaktion mit AsH_2 (30). Bei pH 6,4 beträgt $K = 5,1 \cdot 10^{-9}$. Für pH 7,4 wurde K zu 10^{-8} extrapoliert (31).

Darüber hinaus war es möglich, aus den Kombinationen von AsH_2 mit i-As bzw. i-AsH_2 mit As Radikale zu erzeugen, die in der untersuchten Reaktion ebenso wie die Semidehydro-D(-)-ascorbinsäure als Substrate verwendet wurden. Die Gleichgewichtskonstanten für die Radikalbildung aus den Kombinationen stimmten mit den oben angeführten Werten für K überein.

2. Material und Methoden

2. 1. Verwendete Chemikalien

Folgende Handelsprodukte wurden verwendet:

Trishydroxymethylaminomethan, p. a.; NADH; NAD; NADPH; Alkoholdehydrogenase (Fa. C. F. Boehringer & Söhne, GmbH, Mannheim)

i-AsH_2 , puriss. (Fa. Fluka A.G., Buchs, Schweiz)

DCPIP, p. a.; AsH_2 p. a.; Salzsäure, p.a.; Titriplex III = EDTA-Na_2 , p. a.; Natriumchlorid, p. a.; Magnesiumsulfat, p. a.; Glutathion, p. a. (Fa. E. Merck A.G., Darmstadt)

Eumulgin 286^R = Alkylarylpolglykoläther (Deutsche Hydrierwerke GmbH, Düsseldorf)

^{+) Für die freundliche Überlassung der i-As danke ich Herrn Dr. rer. nat. W. Weis, Biochemisches Institut der Universität Gießen}

Semicarbacid, p. a.; Natriumpyrophosphat, p. a.; Metaphosphorsäure p. a.; Natriumacetat (wasserfrei), p. a.; Natriumhydroxyd, p. a.; Glycocoll nach Sørensen; Kaliumhydrogenphosphat, p. a. (Fa. Riedel de Haen, Seelze).

As und i-As wurden von Dr. W. Weis (Biochemisches Institut der Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. As war nach dem von STAUDINGER und WEIS angegebenen Verfahren (32) gereinigt worden. Das Herstellungsverfahren der i-As wird demnächst beschrieben (33).

2. 2. Mikrosomenpräparation

Für die Gewinnung der Mikrosomen wurden die Lebern von 200-250g schweren weiblichen Wistar-Ratten (AF/Han) verwendet. Die Tiere wurden mit Altromin-Standardfutter für Ratten (Fa. Altromin, Lage/Lippe) gefüttert und erhielten Wasser ad libitum.

Die Präparation der Mikrosomen erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von SCHNEIDER (34). Die Ratten wurden zunächst durch Genickschlag getötet und anschliessend durch Einschnitt in die Carotiden ausgeblutet. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurde die Leber in situ mit 20ml eiskalter isotoner Kochsalzlösung perfundiert, um im Organ befindliches Blut weitgehend zu entfernen.

Die herausgenommenen Lebern wurden in eiskalten Tris (0,02M)/Saccharose (0,25M)-Puffer in einem Verhältnis 1:5 (g:ml) gegeben und mit dem Scherblatthomogenisator Ultra Turrax (TP 18/2, Fa. Janke und Kunkel, Staufen/Breisgau) etwa 2min lang zerkleinert. Die entstandene Suspension wurde im Homogenisator nach POTTER und ELVEHJEM (35) ca. 1min homogenisiert. Dann wurden in einem ersten Zentrifugationsgang (10 800•g, 30min, 4°, Servall-Zentrifuge) Kerne und Mitochondrien abgeschleudert. Der Überstand wurde zur Entfernung des Fettes durch Mull filtriert und anschliessend nochmals zentrifugiert (27 000•g, 30min, 4°, Servall-Zentrifuge). Das Sediment wurde verworfen. Aus dem Überstand, der ebenfalls zunächst durch Mull filtriert wurde, wurde die Mikrosemenfraktion abgeschleudert (105 000•g, 60min, 4°, Spinco-Ultrazentrifuge). Die Mikrosomen wurden in

0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 aufgenommen und erneut homogenisiert.

2. 3. Mitochondrienpräparation

Die Mitochondrienpräparation unterschied sich von der Mikrosomenpräparation nur durch andere Zentrifugationsgänge. Es wurde wie folgt verfahren: Aus dem Homogenat wurden zunächst bei 2500·g(10min) Kerne und größere Teile abgeschleudert. Der Überstand wurde 20min bei 8500·g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,1M Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) aufgenommen und durch zweimalige Zentrifugation (8500·g, 20min) nachgewaschen.

2. 4. Herstellung eines Aufschlusses von Mikrosomen mit dem Detergens Eumulgin 286^R

Für einige Versuche wurden die Mikrosomen mit dem nichtionischen Detergens Eumulgin 286^R aufgeschlossen. Eine derartige "Enzympräparation" war auch in den früheren Untersuchungen über die mikrosomale NADH:Semidehydroascorbinsäure-Oxydoreduktase von LUMPER, SCHNEIDER und STAUDINGER (27) verwendet worden. Es wurde wie folgt verfahren: Die Mikrosomen wurden in 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 9 aufgenommen und mit einem Prozent Eumulgin 286^R versetzt. Danach wurde die Suspension eine Stunde bei 4°C inkubiert und dann zentrifugiert (105 000·g, 60min, 4°C). Das Präcipitat wurde verworfen. Der klare Überstand wurde mit gesättigter Kaliumdihydrogenphosphatlösung auf pH 7,4 eingestellt.

2. 5. Proteinbestimmungen

Der Proteingehalt der verschiedenen Mikrosomen- bzw. Mitochondrienpräparationen wurde mit der Biuretmethode entsprechend den Angaben von BEISENHERZ et al. (36) bestimmt. Die Extinktionsmessungen erfolgten mit dem Photometer Eppendorf bei 546nm Wellenlänge.

2. 6. Messmethodik

Die Enzymaktivität wurde an Hand der NADH-Oxydation bestimmt, die als Extinktionsabnahme bei 366nm im Photometer Eppendorf

messbar ist. Es wurden Küvetten mit 1cm Schichtdicke verwendet; normalerweise wurde bei Zimmertemperatur gearbeitet ($22 \pm 3^{\circ}$). Alle Reaktionen wurden über vier Minuten verfolgt. Die Ablesung der Extinktionen erfolgte in 1-minütigen Abständen. Alle Meßwerte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Da in den untersuchten Ansätzen außer für die Reduktion von $i\text{-AsH}^+$ bzw. AsH^+ auch für andere Reaktionen NADH verbraucht wird, mussten die Extinktionsänderungen jeweils in drei verschiedenen Ansätzen geprüft werden, um daraus die für die $i\text{-AsH}^+$ - bzw. AsH^+ -Reduktion verbrauchte Menge ermitteln zu können. Im einzelnen wurden folgende Werte bestimmt:

A) Hauptwert:

Der Hauptwert (2ml Gesamtvolumen, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4) enthält alle für den Ablauf der Reaktion nötigen Komponenten: NADH, $i\text{-AsH}_2$ bzw. AsH_2 und $i\text{-As}$ bzw. As , mikrosomales Protein aus Rattenleber. In diesem Ansatz wird der gesamte NADH-Verbrauch bestimmt, in dem auch der nicht $i\text{-AsH}^+$ (bzw. AsH^+)-abhängige Anteil enthalten ist.

B) Leerwert I:

Der Leerwert I (2ml Gesamtvolumen, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4) enthält die Komponenten des Hauptwertes mit Ausnahme der $i\text{-As}$ bzw. As . Da hier einer der Partner der Komproportionsreaktion fehlt, kann es in diesem Ansatz auf dem Weg über die Komproportionierung nicht zur Bildung der $i\text{-AsH}^+$ bzw. AsH^+ kommen. Die hier gemessene NADH-Oxydation ist daher nicht auf eine definierte Radikalmenge ($i\text{-AsH}^+$ bzw. AsH^+) beziehbar und muß vom Hauptwert subtrahiert werden.

C) Leerwert II:

Der Leerwert II (Gesamtvolumen 2ml, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4) enthält alle Komponenten des Hauptwertes außer NADH. Es wird eine Extinktionszunahme bei 366nm gemessen, die durch nicht näher untersuchte Reaktionen der $i\text{-As}$ bzw. As im Reaktionsgemisch verursacht wird. Dieser Extinktionsanstieg überlagert die im Hauptwert gemessene, durch NADH-Verbrauch bedingte Extinktionsabnahme mit entgegengesetztem Vorzeichen. Der im Hauptwert bestimmte NADH-Verbrauch ist

demnach gegenüber dem tatsächlichen NADH-Verbrauch um den durch den Leerwert II gegebenen Betrag verringert. Der Leerwert II muß daher zu dem Hauptwert addiert werden. Die für die Reduktion der i-AsH⁺ bzw. AsH⁺ verbrauchte NADH-Menge - ausgedrückt in Extinktionsabnahme pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) - wurde nach folgendem Schema berechnet:

$$\text{NADH-Verbrauch} = \text{Hauptwert} - \text{Leerwert I} + \text{Leerwert II}$$

$$(\Delta E/\text{min}) \quad (\Delta E/\text{min}) \quad (\Delta E/\text{min}) \quad (\Delta E/\text{min})$$

Der NADH-Verbrauch in $\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ergibt sich dann aus folgenden Formeln:

$$E = \xi \cdot d \cdot c$$

$$\Delta E \cdot \text{min}^{-1} = \xi \cdot d \cdot \Delta c \cdot \text{min}^{-1}$$

$$\Delta c \cdot \text{min}^{-1} = \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \xi^{-1} \cdot d^{-1}$$

ξ = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$)

d = Schichtdicke (cm)

c = Konzentration ($\text{Mol} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Die Aktivitätsangaben erfolgten unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration des jeweiligen Ansatzes als spezifische Aktivität in $\text{nMol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$.

2. 7. Bestimmung der Reaktionsprodukte

2. 7. 1. Bestimmung des NAD^+

Die Bestimmung des bei der Reaktion entstehenden NAD^+ wurde in Anlehnung an das Verfahren von KLINGENBERG (37) durchgeführt. Hierzu wurde in einem Testansatz (Zusammensetzung wie beim Hauptwert angegeben) das bis zum Endpunkt der Reaktion aus NADH entstandene NAD^+ enzymatisch rückreduziert. Die Reduktion erfolgte mit Äthanol und wird von dem Enzym Alkoholdehydrogenase katalysiert. Der entstehende Acetaldehyd wird mit Semicarbacid weggefangen. Es wurde zunächst ein Puffer-Reagenz-Gemisch von folgender Zusammensetzung hergestellt (Gesamtvolumen 2ml, pH 8,8):

1,7ml Pyrophosphatpuffer (0,1M) + Glycin (1,6mg/ml)

0,1ml Äthanol (96 %ig)

0,1ml Semicarbacid (25mg/ml)

0,1ml Alkoholdehydrogenase (5,9mg/ml = 1:5 verdünnte Kristallsuspension)

Dem Testansatz wurde nach vollständiger Oxydation des NADH 1ml entnommen und zu dem Puffer-Reagenz-Gemisch gegeben. Der Extinktionsanstieg dieser Lösung wurde unmittelbar nach Zugabe der Probe bei 366nm im Photometer Eppendorf bestimmt. Außerdem wurde noch ein Leerwert bestimmt, indem dem Reagenz-Puffer-Gemisch 1ml aus einem NADH-freien Ansatz zugesetzt wurde. Dieser Wert entspricht dem durch Trübung und sonstige störende Effekte bedingten Extinktionsanstieg.

Aus der Differenz zwischen Haupt- und Leerwert errechnet sich die bei der enzymatischen Reduktion entstandene NADH-Menge. Diese entspricht der NAD^+ -Menge, die im Testansatz vorhanden war.

2. 7. 2. Bestimmung von i-AsH₂

Für die quantitative Bestimmung der i-AsH₂ wurde im Prinzip nach dem (38) modifizierten Verfahren von EVELYN, MALLOY und ROSEN (39) zur Bestimmung von AsH₂ gearbeitet. Bei dieser Methode wird die als Extinktionsabnahme bei 546nm im Photometer Eppendorf meßbare Reduktion einer Dichlorphenolindophenol-Lösung unter dem Einfluß von AsH₂ verwendet. Auch die i-AsH₂ bewirkt diese Extinktionsabnahme und kann ebenso wie AsH₂ in einem Bereich von 2 - 10 µg/ml i-AsH₂ quantitativ bestimmt werden.

Herstellung des Farbreagenzes:

Reagenzien: Lösung 1: 20 mg DCPIP plus 4,6g Natriumacetat (wasserfrei) auf 1000ml gelöst.

Lösung 2: 5 %ige Metaphosphorsäure

Die Lösungen 1 und 2 werden jeweils unmittelbar vor der Messung im Verhältnis 6:1 zusammengegeben. Es entsteht eine violette Lösung, deren Extinktion gegen einen Leerwert aus einer 5 %igen Metaphosphorsäure-Lösung bestimmt wird.

Herstellung des Analysenansatzes:

Die Ansätze, aus denen die quantitative Analyse der i-AsH₂ vorgenommen wurde, enthielten die Reaktionsteilnehmer in einer höheren Konzentration, als sie üblicherweise verwendet wurde, um eine genügend große und damit besser bestimmbare

i-AsH₂-Ausbeute zu erhalten. Auch mußte das Gesamtvolumen des Analysenansatzes auf 4ml erhöht werden, um eine genügende Anzahl von Proben entnehmen zu können. Im einzelnen enthielten die Ansätze: 40 μ Mol i-AsH₂ und i-As äquimolar, 10 μ Mol NADH und zwischen 6 und 12 mg Mikrosomenprotein in 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4.

Diesem Ansatz wurde 1ml entnommen und mit 9ml 5%iger Metaphosphorsäure versetzt. Dadurch wurde die Enzymreaktion gestoppt. Die entstandene Lösung wurde drei Minuten lang bei 2000U/min zentrifugiert. Dem Überstand wurde 0,1ml entnommen und in eine Küvette gegeben, die bereits 4,9ml Farbreagenz-lösung enthielt. Die Extinktionsabnahme des Küvetteninhaltes nach Zugabe der i-AsH₂-enthaltenden Lösung wurde sofort nach Durchmischen abgelesen und die zugehörige i-AsH₂-Menge mit Hilfe einer Eichgeraden ermittelt.

Die Aufstellung der Eichgeraden erfolgte aus Ansätzen, die nur Protein und bestimmte i-AsH₂-Mengen enthielten. Diese Ansätze wurden dann in der gleichen Weise weiterbehandelt, wie es oben für die Analysenansätze beschrieben wurde. Die angegebenen Meßwerte ergaben sich aus Mittelwerten von 4 Einzelbestimmungen.

In Abb.1 ist die für die Auswertung verwendete Eichgerade abgebildet.

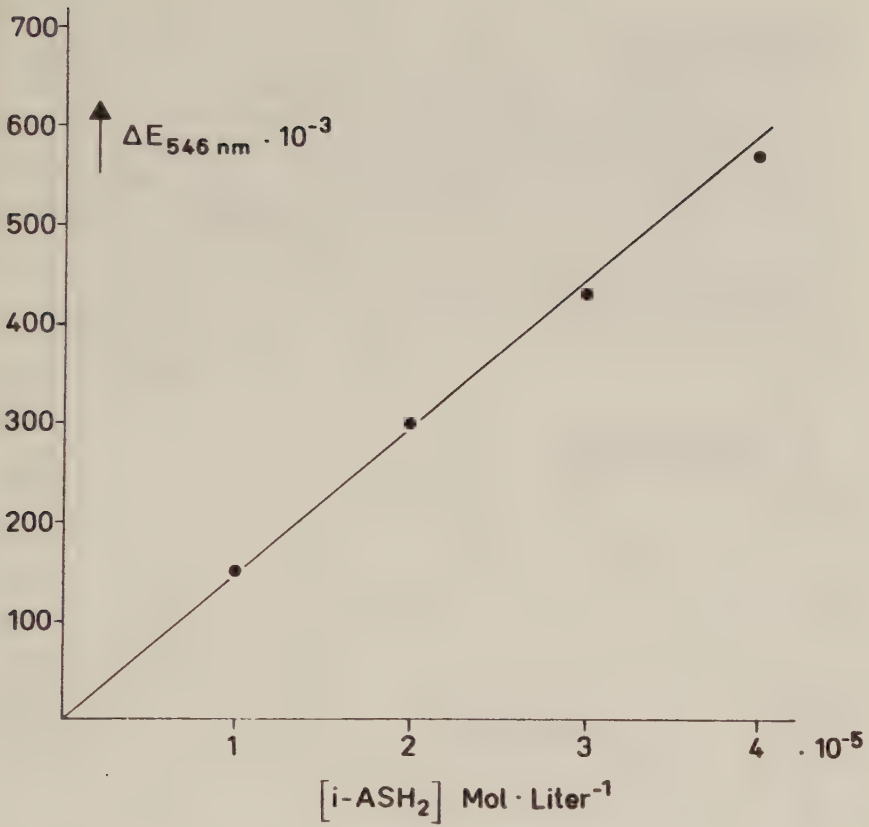


Abb. 1: Eichgerade für die Bestimmung der $i-ASH_2$

3. Ergebnisse

3. 1. Enzymkinetik

3. 1. 1. Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH

Für die Prüfung der pH-Abhängigkeit der Enzymreaktion mit i-AsH⁺ als Substrat wurde mit dem Tris-Puffer gearbeitet, der mit Salzsäure auf verschiedene pH-Werte eingestellt wurde. Da die Verwendung eines anderen Puffers vermieden werden sollte, konnte der pH 7 nicht unterschritten werden. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, besteht ein deutliches pH-Optimum der i-AsH⁺-abhängigen NADH-Oxydation in Mikrosomen bei dem physiologischen pH 7,4.

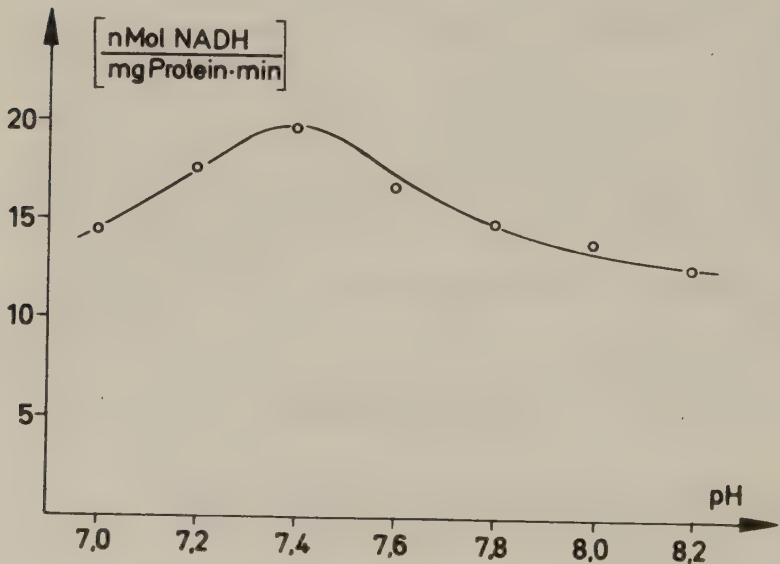


Abb. 2: Abhängigkeit der NADH₂-Oxydation vom pH
Testbedingungen: Je 20 μ Mol i-AsH₂ und As äquimolar,
0,6 μ Mol NADH₂, 1,1mg Protein, 0,1M Tris/HCl-Puffer
vom gewünschten pH im Gesamtvolumen von 2ml ($t=22\pm 3^{\circ}$).

3. 1. 2. Proteinabhängigkeit der Enzymaktivität

Ein wesentliches Kriterium für eine enzymatische Reaktion ist die Proportionalität zwischen der Menge an Enzymprotein und der Umsatzgeschwindigkeit.

Abb. 3 zeigt, daß zwischen dem NADH-Verbrauch (ausgedrückt in $\Delta E_{366\text{nm}}/\text{min}$) für die Reduktion von 1-AsH⁺ und der im Ansatz vorhandenen Proteinmenge im Bereich von 0,35 - 1,75mg/ml Protein eine lineare Beziehung besteht.

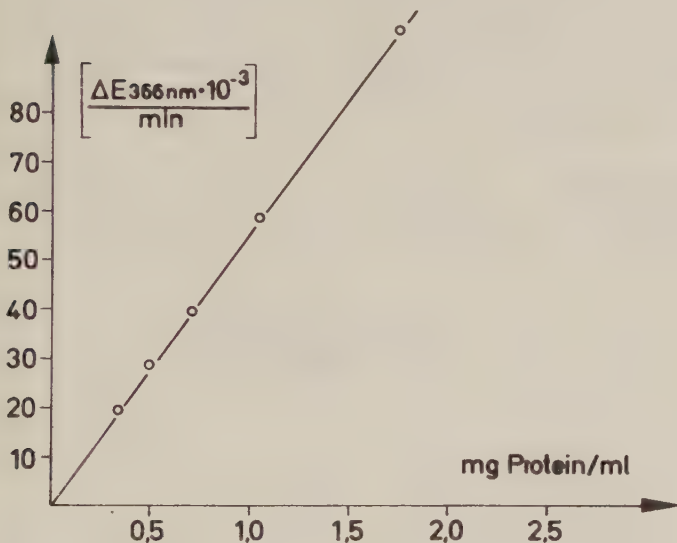


Abb. 3: NADH-Verbrauch in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Testbedingungen: Je 20 μ Mol 1-AsH₂ und 1-As äquimolar 0,6 μ Mol NADH₂, zwischen 0,7 und 3,5mg Protein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$).

3. 1. 3. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur

Bei den Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der i-AsH⁺-abhängigen NADH-Oxydation wurde ein Kryo-Thermostat verwendet, der an die Küvettenhalterung des Photometer Eppendorf angeschlossen wurde. Die Temperatur in der Küvette wurde ständig mit einem Thermometer überprüft.

Abb. 4 bringt die für eine enzymatische Reaktion typische Temperaturabhängigkeit der spezifischen Aktivität zur Darstellung. Das Temperaturoptimum liegt etwa bei 38°. Der Temperaturkoeffizient bei 10° Temperaturdifferenz (sog. "Q₁₀-Wert") betrug 2,8, das heißt bei 35° wurde eine um den Faktor 2,8 größere spezifische Aktivität gemessen als bei 25°.

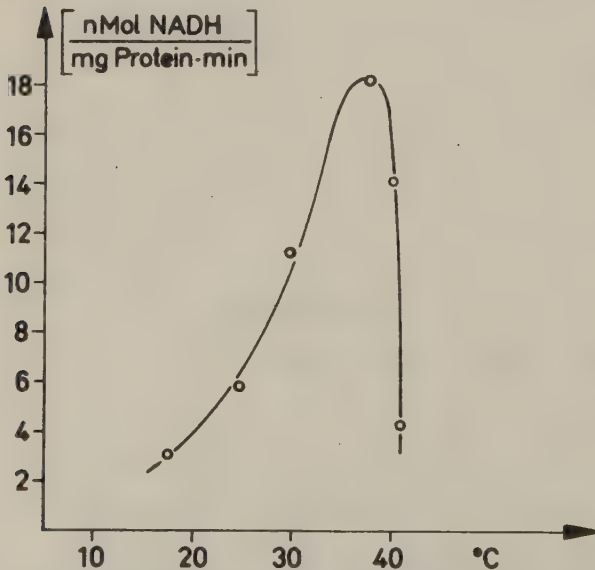


Abb.4: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Temperatur.

Testbedingungen: Je 20 μMol i-AsH₂ und i-As äquimolar, 0,6 μMol NADH₂, 2mg Protein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml. Die Temperatur wurde zwischen 18° und 41° variiert.

3. 1. 4. Ermittlung der scheinbaren Michaelis-Konstanten (K_m)

Die scheinbare Michaelis-Konstante der mikrosomalen NADH-Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase für AsH⁺ war in früheren Untersuchungen (27) mit $4 \cdot 10^{-6} M$ für AsH⁺ und für NADH₂ mit $5 \cdot 10^{-5} M$ angegeben worden.

Die Ermittlung dieser Größe erfolgt am zweckmäßigsten mit dem von LINEWEAVER und BURK (40) angegebenen Verfahren: Es werden die bei den verschiedenen Substratkonzentrationen sich ergebenden Reaktionsgeschwindigkeiten gemessen.

Beide Werte werden jeweils als Reziprokwerte in ein entsprechendes Koordinatensystem eingezeichnet. Man erhält eine Gerade, die die Abszisse bei $-1/K_m$ schneidet. Die jeweiligen Radikalkonzentrationen werden nach der in der Einleitung angegebenen Formel 3a. berechnet (siehe Seite 2).

a) Für die Bestimmung der Michaelis-Konstanten für i-AsH⁺ wurde nicht weiter aufgearbeitetes Mikrosomenprotein verwendet.

Das Ergebnis ist in Abb. 5 dargestellt.

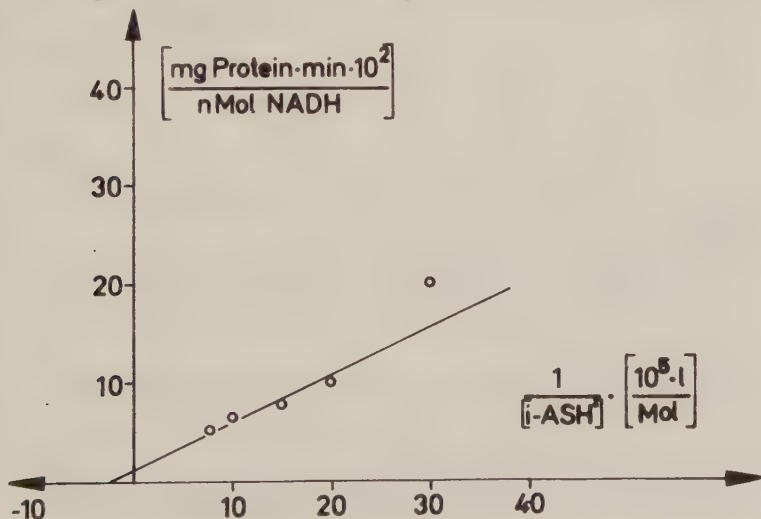


Abb. 5: Bestimmung der scheinbaren K_m für i-AsH₂

Testbedingungen: Je zwischen 7 und 27 μMol i-AsH₂ und i-As äquimolar, 0,6 μMol NADH₂, 1,04mg Protein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$)

Außerdem wurde für die Bestimmung der K_m ein entsprechend den in 2. 4. gemachten Angaben hergestellter "Eumulgin-Aufschluß" verwendet. Die sich dabei ergebende Lineweaver-Burk-Gerade ist in Abb. 6 dargestellt.

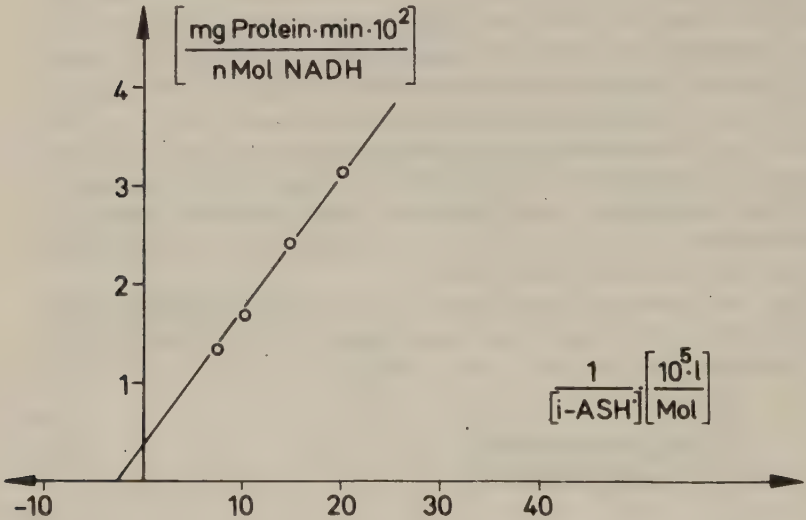


Abb. 6: Bestimmung der scheinbaren K_m für i-AsH⁺ ("Eumulgin-Aufschluß").

Testbedingungen: Je zwischen 10 und 27 μMol i-AsH₂ und i-As äquimolar, 0,6 μMol NADH₂, 2,6mg Mikrosomenprotein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$)

Bei beiden Bestimmungen wurde eine scheinbare Michaelis-Konstante von $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ für i-AsH⁺ gefunden. Dieser Wert ist praktisch identisch mit der K_m für AsH⁺.

b) Die Bestimmung der K_m für NADH erfolgte ebenfalls mit einem "Eumulgin-Aufschluß" (Abb. 7). Die K_m beträgt $6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ für NADH₂. Die in der Darstellung nach LINEWEAVER-BURK erkennbare

Abknickung der Geraden bei höheren NADH-Konzentrationen beruht auf Substrathemmung, die auch beobachtet wird, wenn AsH⁺ als Elektronenacceptor eingesetzt wird (27).

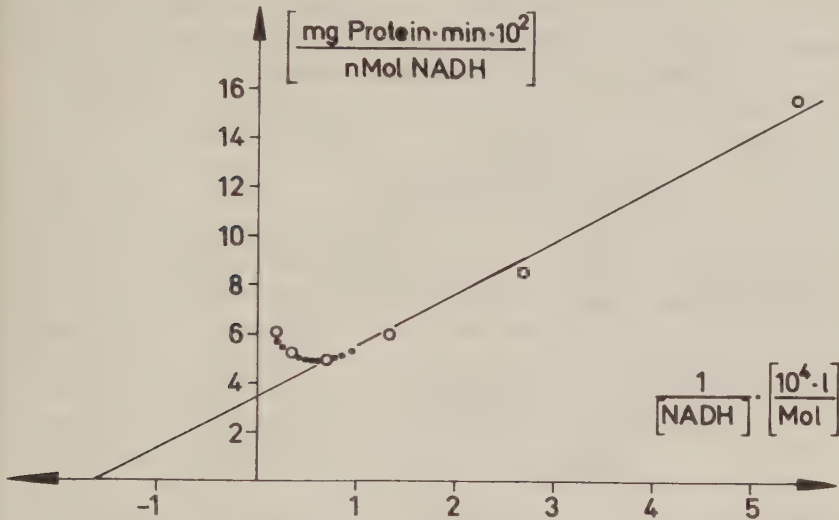


Abb. 7: Bestimmung der scheinbaren K_m für NADH mit i-AsH⁺ als Elektronenacceptor ("Eumulgin-Aufschluß").

Testbedingungen: Je 20 μ Mol i-AsH₂ und i-As äquimolar, zwischen 0,037 und 1,2 μ Mol NADH₂, 0,58mg Protein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($T = 22 \pm 3^\circ$).

3. 1. 5. Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Verhältnis i-AsH₂ : i-As

Wenn man bei konstanter Gesamtsumme i-AsH₂ + i-As das Verhältnis i-AsH₂ : i-As variiert, so muß sich maximale Enzymaktivität für das Verhältnis ergeben, bei dem sich ein Maximum

an radikalischem $i\text{-AsH}^\bullet$ eingestellt. Diese Größe läßt sich durch folgende Rechnung ermitteln:

$$[i\text{-AsH}^\bullet] = \sqrt{K \cdot [i\text{-As}] \cdot [i\text{-AsH}_2]} \quad [i\text{-As}] + [i\text{-AsH}_2] = c(\text{const.})$$

$$[i\text{-AsH}^\bullet] = \sqrt{K \cdot [i\text{-As}] \cdot (c - [i\text{-As}])} \quad [i\text{-AsH}_2] = c - [i\text{-As}]$$

$$[i\text{-AsH}^\bullet] = \sqrt{K \cdot [i\text{-As}] \cdot c - K \cdot [i\text{-As}]^2}$$

$$\frac{d[i\text{-AsH}^\bullet]}{d[i\text{-As}]} = \frac{K \cdot c - 2 \cdot K \cdot [i\text{-As}]}{2 \cdot \sqrt{K \cdot [i\text{-As}] \cdot c - K \cdot [i\text{-As}]^2}}$$

für $[i\text{-AsH}^\bullet] = \text{max}$ gilt:

$$\frac{K \cdot c - 2K \cdot [i\text{-As}]}{2 \cdot \sqrt{K \cdot [i\text{-As}] \cdot c - K \cdot [i\text{-As}]^2}} = 0$$

$$K \cdot (c - 2 \cdot [i\text{-As}]) = 0$$

$$c = 2 \cdot [i\text{-As}]$$

$$[i\text{-As}] = c/2$$

$$[i\text{-AsH}_2] = [i\text{-As}]$$

$[i\text{-AsH}^\bullet]$ liegt also beim Verhältnis 1 : 1 ($[i\text{-AsH}_2] : [i\text{-As}]$) in maximaler Konzentration vor.

Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente sind in Tab.1 zusammengefaßt.

Tab.1: Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Verhältnis $[i\text{-AsH}_2] : [i\text{-As}]$ bei Gesamtsumme $50 \mu\text{Mol}$ pro Ansatz

$i\text{-AsH}_2$ ($\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$)	$i\text{-As}$	$i\text{-AsH}_2 : i\text{-As}$ Verhältnis	Aktivität $\Delta E_{366\text{nm}}/\text{min}$
25	25	1:1	26
30	20	3:2	24
20	30	2:3	24
40	10	4:1	16
10	40	1:4	15

Testbedingungen: $i\text{-AsH}_2$ und $i\text{-As}$ in den angegebenen Mengen, $0,6 \mu\text{Mol}$ NADH_2 , $1,7\text{mg}$ Mikrosomenprotein, $0,1\text{M}$ Tris/HCl -Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2 ml ($t = 22 \pm 3^\circ$).

Da die Radikalkonzentration eine Funktion aus dem Produkt aus reduzierter und oxydierter Ascorbinsäure ist, muß sich jeweils bei zueinander reziproken Verhältnissen der beiden Partner im Komproportionierungsgemisch eine stöchiometrisch gleiche Radikalkonzentration einstellen. Wie aus den in Tab. 1 dargestellten Versuchsergebnissen hervorgeht, weisen Ansätze mit zueinander reziprokem Verhältnis (i-AsH₂ : i-As) gleiche Aktivitäten auf, was zunächst ein weiterer Beweis für die Richtigkeit unserer Vorstellungen von der Radikalerzeugung ist.

Darüber hinaus erlauben diese Ergebnisse aber auch den Schluß, daß keinem der beiden Partner eine die Reaktion hemmende oder begünstigende Wirkung zukommt, sondern daß der Reaktionsablauf nur von stöchiometrischen Gesetzmäßigkeiten bestimmt wird. Zur weiteren Verdeutlichung sind die Ergebnisse einer anderen Versuchsreihe in der Abb.8 graphisch dargestellt. Es ergibt sich eine vollkommen symmetrische Kurve mit dem Gipfel für gleiche Mengen an i-AsH₂ und i-As.

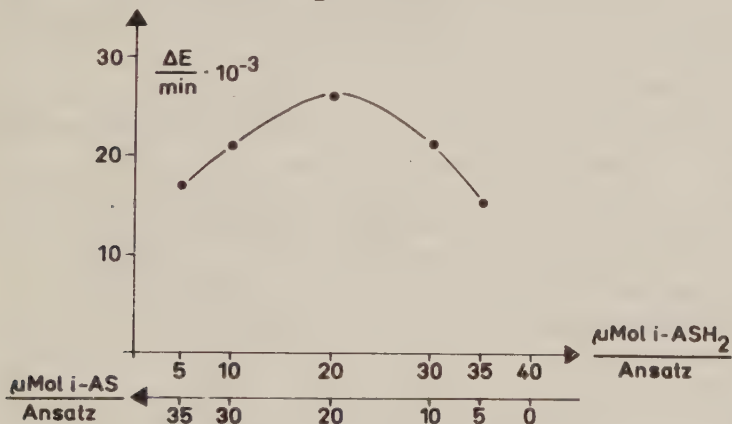
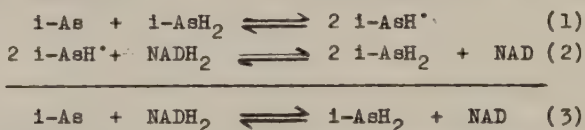


Abb.8: Abhängigkeit der Aktivität vom Verhältnis i-AsH₂ : i-As bei Gesamtsumme 40 μMol pro Ansatz

Testbedingungen: i-AsH₂ und i-As in den angegebenen Mengen, 0,6 μMol NADH₂, 1,6mg Mikrosomenprotein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$).

3. 2. Nachweis der Reaktionsprodukte

Wie in der Einleitung an Hand der $\text{AsH}^{\bullet}$ näher ausgeführt wurde, geht der enzymatischen Reduktion der $\text{i-AsH}^{\bullet}$ durch NADH_2 eine Komproportionierungsreaktion voraus, die zur Bildung der radikalischen $\text{i-AsH}^{\bullet}$ führt. Durch Addition der entsprechenden Gleichungen (1) und (2) ergibt sich Gleichung (3), aus der die bei dem gesamten Vorgang entstehenden Reaktionsprodukte abzulesen sind:



Bei der Oxydation von einem Mol NADH_2 entsteht ein Mol i-AsH_2 neu.

3. 2. 1. Bestimmung der entstandenen i-AsH_2

Die bei der quantitativen Bestimmung der i-AsH_2 angewandte Methode ist im Teil "Material und Methoden" beschrieben.

a) Zunächst wurde die spezifische Aktivität der für die Prüfung der stöchiometrischen Beziehung zwischen NADH -Oxydation und i-AsH_2 -Entstehung verwendeten Mikrosomenpräparation in einem üblichen Testansatz an Hand der NADH -Oxydation bestimmt.

Den Analysenansätzen wurde unmittelbar nach dem Start der Reaktion und nach Ablauf einer 30-minütigen Inkubationszeit jeweils eine Probe zur i-AsH_2 -Bestimmung entnommen. Aus der Differenz der beiden Bestimmungen wurde die neu entstandene i-AsH_2 in $\text{nMol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein ermittelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung gehen aus der Tab. 2 hervor.

Tab. 2: Stöchiometrie der i-AsH₂-Entstehung

Versuch Nr.	NADH - Verbrauch in nMol·min ⁻¹ ·mg Protein ⁻¹ (= spezifische Aktivität)	Entstandene i-AsH ₂ -Menge in nMol·min ⁻¹ ·mg Protein ⁻¹
1	12,7	14,6
2	12,7	14,0
3	13,8	12,3
4	8,4	9,8
5	8,3	7,5

Testbedingungen: Je 40 μMol i-AsH₂ und i-As äquimolar, 10 μMol NADH₂, zwischen 6 und 12 mg Mikrosomenprotein, 0,1 M Tris/HCL-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 4 ml (t = 22 ± 3°)

b) In einer weiteren Untersuchungsreihe sollte die Abhängigkeit der i-AsH₂-Entstehung von der Reaktionszeit geprüft werden. Dazu wurden jeweils aus einem Analysenansatz zwei i-AsH₂-Bestimmungen in größeren Zeitabständen durchgeführt.

In Tab. 3 sind die in der jeweiligen Inkubationszeit entstandenen i-AsH₂-Mengen zusammengestellt.

Tab. 3: Abhängigkeit der i-AsH₂-Entstehung von der Reaktions-

<u>zeit</u>				
Versuch Nr.	1. Messung:		2. Messung:	
	Inkub.-zeit	neu entst.	Inkub.-zeit	neu entst.
		i-AsH ₂		i-AsH ₂
	(min)	(nMol/mg)	(min)	(nMol/mg)
10	30	546	45	1200
11	20	350	40	1000
12	20	546	40	875

Testbedingungen: entsprechend den Angaben der Tab. 2

c) i-AsH₂-Entstehung in abgewandelten Ansätzen

Um nachzuweisen, daß die i-AsH₂-Neuentstehung an das Vorhandensein aller Reaktionspartner gebunden ist, wurde auch in

inkompletten Analysenansätzen der i-AsH₂-Gehalt vor und nach 30-minütiger Inkubationszeit bestimmt. Die Versuchsbedingungen entsprachen sonst den für Versuch 1 - 5 (Tab. 2) angegebenen. In Tab. 4 sind die Ergebnisse und die jeweils veränderten Bedingungen zusammengefaßt.

Tab. 4: i-AsH₂-Bestimmung in abgewandelten Ansätzen

Versuch Nr.	Besonderheiten des Ansatzes	Entstandene i-AsH ₂ -Menge in nMol·min ⁻¹ · mg Protein ⁻¹
13	Vollständiger Ansatz	14,5
14	Ansatz ohne NADH	0
15	Ansatz ohne i-As	2,93
16	Ansatz ohne i-AsH ₂	0
17	PCMB-Zusatz(5·10 ⁻⁴ M)	4,35
18	Ansatz mit gekochtem Protein	0
19	Ansatz ohne Protein	0

In Versuch 15 fand sich trotz fehlender i-As eine allerdings gegenüber dem Vollwert (Versuch 13) geringe i-AsH₂-Neuentstehung. Dieser Befund war nicht regelmäßig zu beobachten und könnte in Einzelfällen darauf beruhen, daß sich i-AsH[•]- oder AsH[•]-Radikale mit im Protein vorhandener As bilden. Das in Versuch 18 verwendete Protein war durch etwa 2-minütiges Kochen denaturiert worden. Anschließend wurde das gekochte Protein mit dem Homogenisator nach POTTER homogenisiert, so daß es wieder als Suspension vorlag. Es zeigte sich, daß das in dieser Weise vorbehandelte Protein enzymatisch unwirksam ist. Die partielle Hemmung der i-AsH[•]-abhängigen NADH-Oxydation durch den Inhibitor PCMB in einer Konzentration von 5·10⁻⁴M konnte in diesem Zusammenhang auch an Hand der verminderten i-AsH₂-Neuentstehung nachgewiesen werden (Versuch 17).

3. 2. 2. Nachweis des entstandenen NAD⁺

Das bei der Reaktion entstehende NAD⁺ wurde nach dem im Teil "Material und Methoden" dargestellten Analysenverfahren bestimmt. Aus der vom Hersteller angegebenen typischen Analyse

wurde die bei vollständiger Oxydation des in die Enzymreaktion eingesetzten NADH_2 zu erwartende NAD^+ -Menge errechnet. Die bei der Analyse gefundenen NAD^+ -Mengen sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Tab. 5: Ergebnisse der NAD^+ -Bestimmung

Versuch Nr.	Nach vollständiger Oxydation des NADH_2 vorhandenes NAD^+		
	errechnet (nMol/ml)	gefunden (nMol/ml)	% der errechneten Menge
1	235	225	96
2	235	265	113
3	235	215	91,5

Testbedingungen: Je $20\mu\text{Mol}$ i-As H_2 i As H_2 und i-As äquimolar, $0,6\mu\text{Mol}$ NADH_2 , $1,4\text{mg}$ Mikrosomenprotein, $0,1\text{M}$ Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$)

Die Ergebnisse beweisen, daß das bei der Reaktion entstehende NAD^+ nicht weiter reagiert.

3. 3. Beeinflussung der Reaktion durch Zusätze

In der bereits zitierten Arbeit von STAUDINGER und Mitarb.(21) aus dem Jahre 1958 wurde in einigen Versuchen der Einfluß bekannter Inhibitoren und Metallionen auf die mikrosomale NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase geprüft.

In den späteren Untersuchungen zur Kinetik der mikrosomalen NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase (27), bei denen erstmals die Komproportionierungsreaktion berücksichtigt wurde, stellten die Autoren fest, daß bei geringer As H^+ -Konzentration eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität eintritt, wenn dem Ansatz NAD^+ zugesetzt wird. Auch NAZEMI (28) prüfte im Zusammenhang mit seinen Untersuchungen über die mitochondriale NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase den Effekt einiger Substanzen auf die Enzymreaktion.

Es erschien interessant, diesen Versuchen, bei denen As H^+ als Substrat verwendet worden war, solche mit i-As H^+ gegenüber-

zustellen. Dabei wurde für die Messungen das im Teil "Material und Methoden" (2. 5.) angegebene Schema sinngemäß verwendet: Der zu prüfende Zusatz wurde jedem der drei in dem Schema aufgeführten Ansätze nach ca. 3-minütiger zusatzfreier Laufzeit zugegeben. Aus den drei Meßwerten läßt sich dann der unter dem Zusatz veränderte, speziell i-AsH'-abhängige NADH-Verbrauch errechnen.

3. 3. 1. Wirkung von Inhibitoren (Tab. 6)

a) PCMB

PCMB geht eine feste Bindung mit SH-Gruppen des Enzymproteins ein, wodurch dieses inaktiviert werden kann.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die Reaktion durch PCMB in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ um 50,5 % bis 63,8 % gehemmt (Tab. 6 Versuch 1 u. 2). Eine völlige Blockierung der Enzymreaktion trat erst bei einer PCMB-Konzentration von 10^{-3} M ein (Tab. 6 Versuch 3). Es war in keinem Fall möglich, die Hemmung des Enzyms nachträglich durch Glutathion aufzuheben.

b) Monojodessigsäure

Monojodessigsäure führte in einer Konzentration von 10^{-2} M zu einem vollständigen Block des Enzyms (Tab. 6 Versuch 4). In 10^{-3} molarer Konzentration war ein Aktivitätsverlust von 30 % zu beobachten (Tab. 9 Versuch 5 u. 6). Eine Aufhebung der Hemmung durch nachträgliche Glutathionszugabe war nicht möglich.

Tab. 6: Wirkung von Inhibitoren

Versuch Nr.	Inhibitor	Konzentration (Mol/l)	Spez. Aktivität		% der Hemmung
			nMol NADH · mg Prot ⁻¹ · min ⁻¹ ohne Inhib.	mit Inhib.	
1	PCMB	5 · 10 ⁻⁴	8,8	3,2	63,8
2	"	"	7,9	3,9	50,4
3	"	10 ⁻³	14	0	100
4	Mono-	10 ⁻²	13,1	0	100
5	jod-	10 ⁻³	12,4	8,8	30
6	essigsr.	"	12,6	8,7	30

Testbedingungen: Je 20 μ Mol i-AsH₂ und i-As äquimolar, 0,6 μ Mol NADH₂, zwischen 1 und 2mg Mikrosomenprotein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml (t = 22 ± 3°).
Inhibitorzusatz in den angegebenen Mengen.

3. 3. 2. Wirkung von Metallionen (Tab. 7)

a) Manganionen (MnSO₄)

Es ist bekannt, daß in vielen Fällen die NADH₂-Oxydation durch Mangan(II)ionen gehemmt wird. STAUDINGER und Mitarb.(21) stellten fest, daß die Ascorbinsäure-abhängige NADH₂-Oxydation in Gegenwart von Mangan-Ionen in einer Konzentration von 10⁻⁴M vollständig gehemmt wird.

Bei den in diesem Zusammenhang angestellten Versuchen mit i-AsH⁺ als Substrat der mikrosomalen NADH-Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase fand sich im Hauptwert eine um 27 % verminderte NADH-Oxydation unter dem Einfluß von MnSO₄ (10⁻³M).

Es erwies sich bei diesen Untersuchungen als besonders wichtig, auch die Leerwerte auf ihre Manganempfindlichkeit zu prüfen. Dabei stellte sich nämlich heraus, daß der Leerwert 1 nach der Manganzugabe um den gleichen Betrag verkleinert wird wie der Hauptwert. Hieraus muß geschlossen werden, daß die i-AsH⁺-abhängige NADH-Oxydation durch Mangan-Ionen nicht beeinflussbar ist (Tab. 7 Versuch 1 - 3), sondern daß die durch Mangan-Ionen herbeizuführende Verringerung des Hauptwertes auf der Hemmung

anderer NADH-verbrauchender Prozesse beruht. Zur weiteren Veranschaulichung dieser Verhältnisse wurden in der Abb. 9 die einzelnen für die Prüfung der Manganempfindlichkeit wesentlichen Meßgrößen (als Mittelwerte) graphisch dargestellt. Dabei entspricht die Höhe der Säulen dem Hauptwert (in $\Delta E/\text{min}$), der schraffierte Anteil darin dem Leerwert 1. Der aus der Differenz sich ergebende nicht schraffierte Teil der Säulen stellt die speziell i-AsH'-abhängige NADH-Oxydation dar. Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist in den mit MnSO_4 versetzten Ansätzen (rechte Säule) der Betrag der NADH-Oxydation im ganzen gegenüber den normalen Ansätzen (linke Säule) verringert, die Differenz zwischen Hauptwert und Leerwert 1 stimmt jedoch in beiden Fällen überein.

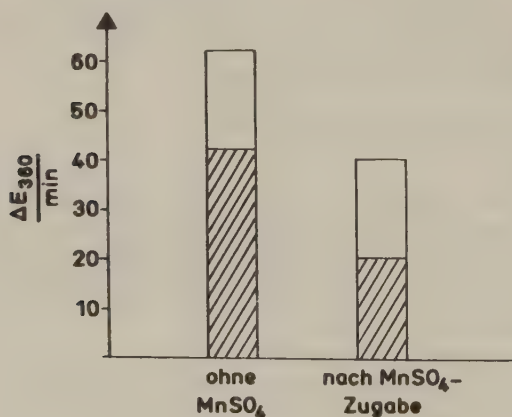


Abb. 9 Einfluß von MnSO_4 auf den Hauptwert und Leerwert 1
Testbedingungen: Je $20\mu\text{Mol}$ i-AsH₂ und i-As äquimolar, $0,6\mu\text{Mol}$ NADH₂, $1,4\text{mg}$ Mikrosomenprotein, $0,1\text{M}$ Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$). Der Mn-Zusatz war 10^{-3}M im Ansatz.
Nähere Erläuterungen sind dem Textteil zu entnehmen

b) Magnesiumionen (MgCl_2)

Nach Zugabe von MgCl_2 in einer Konzentration von 10^{-3}M im Ansatz verringerte sich die spezifische Aktivität der untersuchten Enzymreaktion um durchschnittlich 9,3% (Tab. 7, Versuch 4 und 5). Die Hemmung war mit Titriplex III nicht aufhebbar.

c) Eisen(II)ionen (FeSO_4)

Mit FeSO_4 in einer Konzentration von 10^{-3}M im Ansatz ließ sich kein Einfluß auf die Reaktion nachweisen (Tab. 7, Versuch 6 und 7).

Tab. 7: Wirkung von Metallionen

Versuch Nr.	Salz	Konzentration (Mol/l)	Spez. Aktivität (nMol NADH · mg Prot. $\cdot$ min $^{-1}$)		% der Hemmung
			ohne Zusatz	mit Zusatz	
1	MnSO_4	10^{-3}	13,9	13,9	0
2	"	"	12,5	13	0
3	"	"	12,5	12,5	0
4	MgCl_2	10^{-3}	11,2	10,1	10
5	"	"	11,7	10,7	8,6
6	FeSO_4	10^{-3}	12	12	0
7	"	"	13,1	13,3	0

Testbedingungen: Je $20\mu\text{Mol}$ i-AsH $_2$ und i-As äquimolar, $0,6\mu\text{Mol}$ NADH $_2$, 1,4mg Mikrosomenprotein, 0,1M Tris/HCl-Puffer im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$). Die jeweils zugesetzten Salze sind in der Tabelle vermerkt.

3. 3. 3. Wirkung von NAD^+

STAUDINGER und Mitarb. (27) fanden bei der mikrosomalen NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase eine Begünstigung der Reaktion durch NAD^+ für kleine AsH $^\cdot$ -Konzentrationen. Eine Hemmung der Enzymreaktion durch NAD^+ wurde nicht beschrieben. Hingegen fand NAZEMI (28, 29) eine Hemmung des mitochondrialen Enzyms durch NAD^+ , die um so ausgeprägter war, je höher die

NAD^+ -Konzentration war. Er hat diese Tatsache in seiner Dissertation als einen der Unterschiede zwischen dem mitochondrialen und dem mikrosomalen Enzym hervorgehoben.

Bei den Untersuchungen mit i-AsH^+ als Substrat fand sich ein hemmender Einfluß des NAD^+ bei den üblicherweise verwendeten Substratkonzentrationen. Wie aus der Tabelle 8 ersichtlich ist, wird die Enzymaktivität bei einer NAD^+ -Konzentration von 10^{-3}M im Ansatz um durchschnittlich 22% vermindert (Versuch 1 bis 3). Vollständige Blockierung des Enzyms tritt bei einer NAD^+ -Konzentration von $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ ein (Versuch 6 und 7). Weitere Werte sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tab. 8: Einfluß von NAD^+ in verschiedenen Konzentrationen auf die Enzymreaktion

Versuch Nr.	NAD^+ -Konz. (Mol/l)	Spez. Aktivität (nMol $\text{NADH} \cdot \text{mg Prot.}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		% der Hemmung
		ohne NAD^+	mit NAD^+	
1	10^{-3}	14,1	11,6	17,5
2	"	15	11,2	25,5
3	"	13,1	10,2	22,2
4	$2 \cdot 10^{-3}$	10	2,4	76
5	"	11	3	77
6	$3 \cdot 10^{-3}$	11,5	0	100
7	"	14	0	100

Testbedingungen: Je $20\mu\text{Mol}$ i-AsH_2 und i-As äquimolar, $0,6\mu\text{Mol}$ NADH_2 , $1,25\text{mg}$ Mikrosomenprotein, $0,1\text{M}$ Tris/ HCl -Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$). NAD^+ -Zusätze in den angegebenen Konzentrationen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde außerdem geprüft, welchen Einfluß das NAD^+ auf die Enzymreaktion bei verschiedenen i-AsH^+ -Konzentrationen hat. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind aus der Tabelle 9 ersichtlich. Die NAD^+ -Konzentration war 10^{-3}M im Ansatz. Es zeigte sich, daß der Hemmeffekt des NAD^+ bei höheren Radikalkonzentrationen ausgeprägter ist.

Eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität ist nur bei der sehr kleinen i-AsH'-Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-7}M$ (entsprechend je $5\mu\text{Mol}$ i-AsH₂ und i-As) nachweisbar.

Tab. 9: Einfluß des NAD⁺ auf die Enzymreaktion bei verschiedenen Konzentrationen an i-AsH'

μMol i-AsH ₂ und i-As pro Ansatz	Spezifische Aktivität (nMol NADH·mg Prot. ⁻¹ min ⁻¹)	
	ohne NAD ⁺	mit 2 Mol NAD ⁺ /Ansatz ($10^{-3}M$)
35	13	11,3
30	14	11
25	13,4	10,4
20	13,4	11,7
10	9,6	9,3
5	3	4,5

Testbedingungen: Je zwischen 5 und $35\mu\text{Mol}$ i-AsH₂ und i-As äquimolar, $0,6\mu\text{Mol}$ NADH₂, 1,25mg Mikrosomenprotein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen 2ml ($t = 22 \pm 3^{\circ}$).

3. 3. 4. Begasung des Ansatzes mit Kohlenmonoxyd

Um die Frage zu klären, ob das CO-empfindliche Hämoprotein Cytochrom P₄₅₀ an der Reaktion beteiligt ist, wurde die Enzymaktivität auch nach Begasung des Ansatzes mit Kohlenmonoxyd bestimmt.

Dazu wurde Kohlenmonoxyd unter mäßigem Druck in die Mikrosomen und Puffer enthaltenden Küvetten eingeleitet. Es wurden verschieden lange Begasungen durchgeführt (zwischen 30sec und 3,5min). In keinem Fall ließ sich ein Unterschied zwischen begasten und nicht begasten Ansätzen finden.

3. 3. 5. Verwendung gewaschener Mikrosomen

In einer weiteren Untersuchungsreihe sollte geprüft werden, ob sich die Enzymaktivität ändert, wenn die Mikrosomen mit isotoner Kaliumchlorid-Lösung nachgewaschen werden.

Hierzu wurden die Mikrosomen nach Beendigung des üblichen Herstellungsganges in 1,18%-iger(isotoner) KCl-Lösung aufgenommen und 60min bei 105000g zentrifugiert (Spinco-Zentrifuge). Die Tabelle 10 zeigt die verschiedenen Meßwerte, die für die gewaschene und nicht gewaschene Mikrosomenpräparation gefunden wurden.

Tab. 10: Vergleich zwischen der Enzymaktivität nicht gewaschener und in isotoner KCl-Lösung gewaschener Mikrosomen

	Hauptwert	Leerwert 1	Leerwert 2	Aktivität	Spez. Aktivität
	$(10^{-2} \Delta E \cdot \text{mg Prot.}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$				$(\text{nMol NADH} \cdot \text{mg Prot.}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$
gewaschen	5,4	0,75	1,25	5,9	36,1
nicht gewaschen	5,4	1,5	0,5	4,4	26

Testbedingungen: Je $20 \mu\text{Mol}$ i-AsH₂ und i-As äquimolar, $0,6 \mu\text{Mol}$ NADH₂, Mikrosomenprotein (1,6mg gewaschene Mikrosomen, 0,8mg nicht weiter verarbeitete Mikrosomen), 0,1M Tris/HCl-Puffer von pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^{\circ}$)

Für die gewaschenen Mikrosomen liegt die spezifische Aktivität höher als für nicht gewaschene. Die Aufführung der einzelnen Messungen in der Tabelle 10 läßt erkennen, daß die unterschiedliche Aktivität der beiden Mikrosomenpräparationen sich allein aus den verschiedenen großen Leerwerten ergibt, wobei die beiden Hauptwerte völlig übereinstimmen.

3. 4. Aus verschiedenen Kombinationen gebildete Komproportionierungsgemische

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, war es auch möglich, Radikale zu erzeugen, deren Komproportionierungsgemisch einen Partner aus der D(-)-Ascorbinsäurereihe und einen aus der L(+)-Ascorbinsäurereihe enthielt (Seite 4). Man erhält dabei Radikale aus folgenden Zusammensetzungen: i-AsH₂/As und AsH₂/i-As. Es gelang zwar, auf ESR-spektrosko-

pischem Weg die Gleichgewichtskonstante K für die Entstehung der Radikale zu messen, doch konnte bisher keine brauchbare Methode gefunden werden, mit deren Hilfe die Konfiguration der entstehenden Semidehydroascorbinsäure bestimmt werden kann. Desgleichen ließen die zur Verfügung stehenden analytischen Methoden die Entscheidung nicht zu, ob die durch die enzymatische Reduktion mit NADH entstehende Ascorbinsäure der L- oder D-Konfiguration zuzuordnen ist.

3. 4. 1. Vergleich der Aktivitäten der vier Kombinationen im Komproportionierungsgemisch für eine konstante Radikalkonzentration.

In der folgenden Untersuchung wurden jeweils in einer Versuchsreihe die Enzymaktivitäten für die beiden "gemischten" Radikale sowie für die "reine" $i\text{-AsH}^\bullet$ und $\text{AsH}^\bullet$ bei konstanter Radikalkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse gehen aus Tabelle 11 hervor. Es handelt sich um drei völlig getrennte Untersuchungen, für die jeweils alle Einwaagen neu vorgenommen wurden und drei verschiedene Mikrosomenpräparationen hergestellt wurden.

Tab. 11a: Enzymaktivitäten der verschiedenen Kombinationen im Komproportionierungsgemisch

Radikalzusammensetzung	Spezifische Aktivität (nMol NADH · mg Prot. ⁻¹ · min ⁻¹)		
	1	2	3
AsH_2/As	17	12,8	20
$i\text{-AsH}_2/i\text{-As}$	20,4	15,6	24,5
$\text{AsH}_2/i\text{-As}$	41	30	42,5
$i\text{-AsH}_2/\text{As}$	9,3	5,8	13,5

Tab. 11b: Angabe der Verhältniszahlen für die in Tab. 11a aufgeführten Enzymaktivitäten

Versuch Nr.	AsH_2/As	$\text{i-AsH}_2/\text{i-As}$	$\text{AsH}_2/\text{i-As}$	$\text{i-AsH}_2/\text{As}$
1	1	1,2	2,4	0,55
2	1	1,2	2,3	0,45
3	1	1,2	2,1	0,66

Testbedingungen: Je 20 μ Mol reduzierte plus oxydierte L(+) -bzw. D(-)- Ascorbinsäure äquimolar in der angegebenen Zusammensetzung, 0,6 μ Mol NADH₂, Mikrosomenprotein (1: 1,5mg; 2: 1,1mg; 3: 1,6mg), 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$).

Es ist ersichtlich, daß die verschiedenen Radikale von dem Enzysystem mit unterschiedlicher Aktivität umgesetzt werden. Die weitaus größte Aktivität wird dabei für das "Mischradikal" aus AsH_2 und i-As beobachtet, während das zweite "gemischte" Radikal $\text{i-AsH}_2/\text{As}$ die niedrigste Aktivität zeigt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, daß die Enzymaktivität für $\text{i-AsH}^\cdot$ größer ist als für die physiologische $\text{AsH}^\cdot$. Im Teil b) der Tabelle 11 wird angegeben, in welchem Verhältnis die Aktivitäten der verschiedenen Radikale zueinander stehen. Es lassen sich dabei im Durchschnitt folgende Verhältniszahlen ermitteln: 1: 1,2: 2,3 : 0,5 ($\text{AsH}_2/\text{As} : \text{i-AsH}_2/\text{i-As} : \text{AsH}_2/\text{i-As} : \text{i-AsH}_2/\text{As}$).

3. 4. 2. Ermittlung der Michaelis-Konstanten für die vier Kombinationen im Komproportionierungsgemisch (nach Lineweaver-Burk)

Nachdem festgestellt worden war, daß die vier möglichen Radikalformen von der Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase mit unterschiedlicher Aktivität reduziert werden, erschien es interessant, zu klären, ob diese Tatsache auf grundsätzliche Unterschiede in den Bindungsverhältnissen zwischen Enzym und Substrat zurückzuführen ist.

Es wurden daher unter Verwendung der gleichen Mikrosomenpräparation die Michaelis-Konstanten für die vier Radikaltypen nach der Methode von LINEWEAVER und BURK (40) ermittelt. Die dabei entstehenden vier Geraden sind in Abbildung 10 dargestellt.

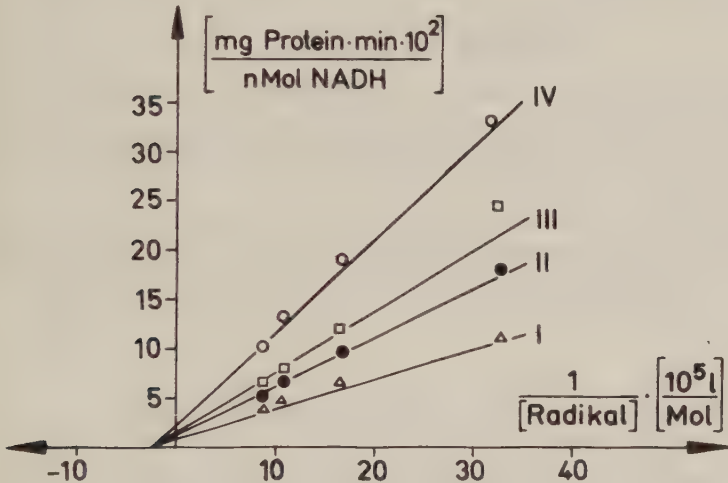


Abb.10: Bestimmung der Michaelis-Konstanten für die vier möglichen Radikaltypen

Testbedingungen: Je zwischen 6 und 24 μMol i-AsH₂ bzw. AsH₂ und i-As bzw. As äquimolar (I: AsH₂/i-As; II: i-AsH₂/i-As; III: AsH₂/As; IV: i-AsH₂/As), 0,6 μMol NADH₂, 1,2mg Mikrosomenprotein, 0,1M Tris/HCl-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22 \pm 3^\circ$).

Das Diagramm erlaubt im einzelnen folgende Feststellungen:
1. Alle vier Geraden schneiden die Abszisse in einem Punkt, d.h. die scheinbaren Michaelis-Konstanten der vier möglichen Radikaltypen sind gleich. Die in dieser Untersuchung gefundene Michaelis-Konstante von $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ entspricht dem Wert,

der auch für alle anderen Bestimmungen mit i-AsH[•] als Substrat gefunden wurde.

2. Die vier Geraden schneiden die Ordinate alle in verschiedener Höhe.

Diese Schnittpunkte stellen die Größe $1/v_{\max}$ dar, was aus der folgenden für die Geraden gültigen Gleichung abgeleitet werden kann:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max} \cdot S} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Im Ordinatenschnittpunkt ist $1/S = 0$. Der Wert gilt demnach für eine unendliche Substratkonzentration, was zugleich Bedingung für $v_{\max}$ ist. Entsprechend erhält man unter diesen Bedingungen $1/v = 1/v_{\max}$.

Die Gleichung läßt weiterhin erkennen, daß die Steigung der Geraden durch $K_m/v_{\max}$ gegeben ist. Da die vier Radikaltypen bei übereinstimmender K_m verschiedene Maximalgeschwindigkeiten aufweisen, besitzen auch die Geraden unterschiedliche Steigungen.

3. 4. 3. Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Verhältnis AsH₂ : i-As bzw. i-AsH₂ : As

Der folgenden Untersuchungsreihe liegt die gleiche Fragestellung für die "gemischten" Radikale zugrunde, wie sie im Teil 3. 1. 5. für i-AsH[•] schon erörtert wurde. Bei konstanter Gesamtsumme AsH₂ + i-As bzw. i-AsH₂ + As wurde das Verhältnis der beiden Komproportionierungspartner variiert. Es sollte hier in erster Linie nachgeprüft werden, ob sich bei zueinander reziproken Verhältnissen, für die jeweils stöchiometrisch gleiche Radikalkonzentrationen gelten, die Aktivität für die "gemischten" Radikale unterscheidet. Aus der Tabelle 12a und b sind die Versuchsergebnisse ersichtlich.

Auch hier ist entsprechend der früheren Forderung beim Verhältnis 1 : 1 (oxydierte Ascorbinsäure : reduzierte Ascorbinsäure) die größte Enzymaktivität zu messen.

Bei den zueinander reziproken Verhältnissen läßt sich keine einheitliche Tendenz im Hinblick auf eine Hemmung oder Begünstigung der Reaktion bei Überwiegen einer der beiden Diastereomere erkennen. (Die geringen Aktivitätsunterschiede sind methodisch bedingt).

Auch bei den "gemischten" Radikalen ist demnach der NADH-Verbrauch abhängig von der Konfiguration und Konzentration des Radikals, wobei es ohne Bedeutung ist, in welchem Verhältnis die Komproportionierungspartner an der Bildung der entsprechenden Radikalkonzentration beteiligt sind.

Tab.12: Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Verhältnis

AsH_2 : i-As bzw. i- AsH_2 : As bei konstanter Gesamtsumme

Gesamtsumme ($\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$)	a) AsH_2 ($\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$)	i-As ($\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$)	AsH_2 Verhältnis	i-As Verhältnis	Spez. Aktivität ($\text{nMol NADH} \cdot \text{mg Prot.}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
40	20	20	1	1	24,2
	30	10	3	1	21,2
	10	30	1	3	19,8
	35	5	7	1	17,9
	5	35	1	7	17,9
50	25	25	1	1	29
	30	20	3	2	25,8
	20	30	2	3	25,4
	40	10	4	1	18,8
	10	40	1	4	16,4
60	30	30	1	1	22,4
	50	10	5	1	18,6
	10	50	1	5	20
b) i- AsH_2 : As					
50	i- AsH_2	As	i- AsH_2	As	
	25	25	1	1	11,8
	30	20	3	2	8,8
	20	30	2	3	8,6
	40	10	4	1	5,3
	10	40	1	4	6,7

Testbedingungen: (zu Tab.12) AsH_2 und i-As bzw. i- AsH_2 und As entsprechend den Angaben, $0,6\mu\text{Mol}$ NADH_2 , $1,2\text{mg}$ Mikrosomenprotein, $0,1\text{M}$ Tris/HCL-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22\pm 3^\circ$).

3.5. Das mitochondriale Enzym

Wie bereits früher erwähnt wurde, ist sowohl in der mikrosomalen als auch in der mitochondrialen Zellfraktion eine NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase nachweisbar.

NAZEMI (28) hat bei seinen Untersuchungen über dieses mitochondriale Enzymsystem geprüft, ob auch bei Verwendung der i- AsH_2 anstelle der AsH_2 im Komproportionierungsgemisch eine Enzymaktivität nachweisbar ist. Im Sinne der bisherigen Ausführungen hat NAZEMI damit ein aus i- AsH_2 und As zusammengesetztes "gemischtes" Radikal als Substrat verwendet.

Da den damaligen Untersuchern die i-As noch nicht zur Verfügung stand, konnte die i- $\text{AsH}^\bullet$ als Substrat für das mitochondriale Enzym nicht eingesetzt werden.

Es sollten daher die mit der Mikrosomenfraktion gewonnenen Ergebnisse ergänzt werden, indem die Aktivität des in der Mitochondrienfraktion enthaltenen Enzyms für die vier verschiedenen Radikaltypen zusammengestellt wurde. Hierzu wurde eine nach dem im Teil "Material und Methoden" angegebenen Verfahren hergestellte Mitochondrienpräparation verwendet. Tabelle 13 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

Tab.13: Die Aktivität des mitochondrialen Enzyms für die vier verschiedenen Radikaltypen

Radikaltyp	Spezifische Aktivität ($\text{nMol NADH} \cdot \text{mg Prot.}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
AsH_2/As	7
$\text{AsH}_2/\text{i-As}$	13
i- $\text{AsH}_2/\text{i-As}$	4,5
i- AsH_2/As	3

Testbedingungen: Je $20\mu\text{Mol}$ AsH_2 bzw. i- AsH_2 und As bzw. i-As äquimolar, $0,6\mu\text{Mol}$ NADH_2 , $1,9\text{mg}$ Mitochondrienprotein, $0,1\text{M}$ Tris/HCL-Puffer vom pH 7,4 im Gesamtvolumen von 2ml ($t = 22\pm 3^\circ$).

Wie aus der Tabelle ersehen werden kann, zeigt auch das mitochondriale Enzym für ein aus AsH_2 und i-As zusammengesetztes Radikal die maximale Aktivität. Im Unterschied zu den Verhältnissen bei Mikrosomen liegt jedoch die Aktivität für das Substrat $\text{AsH}^\bullet$ höher als für $\text{i-AsH}^\bullet$. Für das "gemischte" Radikal $\text{i-AsH}_2/\text{As}$ findet sich eine Aktivität, die um 57% niedriger liegt als für $\text{AsH}^\bullet$. NAZEMI (28) fand für dieses Radikal 36% der für $\text{AsH}^\bullet$ beobachteten Aktivität.

Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, die Kinetik der mitochondrialen $\text{NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase}$ für das Substrat $\text{i-AsH}^\bullet$ zu beschreiben. Im Vorgriff darauf kann jedoch schon jetzt gesagt werden, daß sicher auch das mitochondriale Enzym keine ausgeprägte Stereospezifität in Hinblick auf die sterische Konfiguration an C_5 des Substrates aufweist.

3. 6. Reduktion durch NADPH_2

In den früheren Untersuchungen kamen H. KERSTEN, W. KERSTEN und STAUDINGER (21) zu dem Schluß, daß die damals untersuchte "Ascorbinsäure-abhängige NADH-Oxydase in Nebennierenmikrosomen" nur NADH , nicht aber NADPH oxydieren kann.

Auch NAZEMI (28) konnte keine $\text{AsH}^\bullet$ -abhängige NADPH-Oxydation in Mitochondrien nachweisen.

Mit dem hier untersuchten mikrosomalen Enzymsystem war es jedoch möglich, in Gegenwart von NADPH sowohl $\text{AsH}^\bullet$ als auch $\text{i-AsH}^\bullet$ zu reduzieren. In beiden Fällen war eine Enzymaktivität nachweisbar, die um 57 bis 67% niedriger war als die des Vergleichsansatzes mit NADH .

4. Diskussion

Wie die vorliegende Untersuchung beweist, katalysiert die mikrosomale NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase (E.C.1.6.5.4) die Reduktion auch der i-AsH[•] durch NADH. Demnach besitzt dieses Enzym keine ausgeprägte Stereospezifität gegenüber dem physiologischen Substrat AsH[•]. Der Vergleich der im Abschnitt 3. 1. mitgeteilten enzymkinetischen Daten für i-AsH[•] als Substrat der NADH:Semidehydroascorbinsäure-Oxydoreduktase mit denen für das Substrat AsH[•] (27) erlaubt folgende Feststellungen: Der Wert für das pH-Optimum der Enzymreaktion, sowie die Michaelis-Konstanten (für i-AsH[•] und NADH) stimmen für beide Substrate überein. Auch das für i-AsH[•] ermittelte Temperatur-optimum der Reaktion entspricht dem für AsH[•].

Die in Abschnitt 3. 1. 2. beschriebene Proportionalität zwischen Enzymaktivität und Proteinmenge pro Ansatz spricht für den enzymatischen Charakter der Reaktion auch für die i-AsH[•]. Ebenso wie es für die AsH[•] beschrieben wurde, ist die K_m für i-AsH[•] unverändert, wenn anstelle der nicht weiter behandelten Mikrosomenpräparation ein Aufschluß mit dem Detergens Eumulgin 286^R verwendet wird (Abb.6). Wahrscheinlich wird durch dieses Solubilisierungsverfahren eine Anreicherung des Enzyms erreicht. Auch spricht die Übereinstimmung dafür, daß die für die Mikrosomenpräparation ermittelten kinetischen Daten die echten Werte darstellen. Es muß jedoch betont werden, daß wegen der Unreinheit aller bisherigen Enzympräparationen hinsichtlich der Wechselzahl des Enzyms höchstens eine Abschätzung vorgenommen werden kann (27).

Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Partner im Komproportionierungsgemisch die Enzymreaktion über ihre Beteiligung an der Radikalbildung hinaus beeinflussen (Abschnitt 3. 1. 5.). Die mathematisch abgeleitete Forderung, daß die Enzymaktivität ein Maximum beim Verhältnis i-AsH₂ : i-As gleich 1 : 1 haben muß, wurde durch die Versuchsergebnisse erfüllt.

Die bei der enzymatischen Reaktion entstehenden Reaktionsprodukte wurden quantitativ analysiert (Abschnitt 3. 2.).

Es konnte dabei nachgewiesen werden, daß die Stöchiometrie zwischen NADH-Oxydation und i-AsH₂-Entstehung gewahrt ist. Es zeigte sich weiterhin, daß bei Fehlen eines der im vollständigen Ansatz (Hauptwert) vorhandenen Reaktionsteilnehmer keine oder keine nennenswerte i-AsH₂-Entstehung nachgewiesen werden kann.

Im Abschnitt 3. 3. der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß einiger Zusätze auf die Enzymreaktion geprüft. Der durch PCMB herbeizuführende Hemmeffekt auf die Reaktion entspricht dem bei vielen anderen Enzymen zu beobachtenden Effekt. Offenbar sind die Veränderungen, die das Enzym durch die irreversible Bindung des PCMB-Moleküls erfährt, so entscheidend, daß die NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase nicht mehr wirksam sein kann. Der Einfluß des PCMB ist nicht nur an Hand des verminderten NADH-Verbrauchs erkennbar, sondern zeigt sich auch bei der i-AsH₂-Analyse eines PCMB-enthaltenden Ansatzes (Tab. 4, Versuch 17): Die i-AsH₂-Ausbeute ist deutlich geringer als bei den Vergleichsansätzen ohne PCMB.

Die Hemmung der Reaktion durch Monojodessigsäure tritt erst bei einer so hohen Inhibitorkonzentration ein, daß hier vielleicht die denaturierende Wirkung der Substanz im Vordergrund steht.

Gegenüber dem Einfluß von Metallionen zeigte sich das Enzym relativ beständig. Nur durch Magnesiumionen konnte die Reaktion in geringem Maße gehemmt werden. Der nach früheren Untersuchungen (21) zu vermutende hemmende Einfluß von Mangan(II)ionen kann bei der i-AsH⁺-abhängigen NADH-Oxydation nicht gefunden werden, wenn der Einfluß dieses Ions auch auf den Leerwert berücksichtigt wird (vgl. dazu Abb.9).

Die Hemmung der NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase durch Zusätze von NAD⁺ ist sicher nicht nur bei dem mitochondrialen Enzym möglich, wie es NAZEMI (28, 29) annahm. Es ist den vorliegenden Versuchsergebnissen (Abschnitt 3. 3. 3.) zu entnehmen,

daß auch die mikrosomale $i\text{-AsH}^{\bullet}$ -abhängige NADH-Oxydation je nach Konzentration des NAD^{+} -Zusatzes bis zu 100% gehemmt wird. Dies gilt jedoch nur bei hohen $i\text{-AsH}^{\bullet}$ -Konzentrationen (Tab.9). Der Hemmeffekt des NAD^{+} wird mit Abnahme der Radikalkonzentration immer geringer, um schließlich bei einer $i\text{-AsH}^{\bullet}$ -Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ (entsprechend 25% der sonst verwendeten Konzentration) in eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität umzuschlagen. Diese Steigerung bei kleiner Radikalkonzentration steht im Einklang mit den früheren Untersuchungen mit $\text{AsH}^{\bullet}$ (27). Die enzymatische Reduktion eines Ascorbinsäureradikals ist nicht daran gebunden, daß dieses aus einem Komproportionierungsgemisch mit zwei Partnern der gleichen sterischen Reihe gebildet wird, wie die im Abschnitt 3. 4. beschriebenen Versuche zeigen. Interessant ist nun, daß die vier möglichen Kombinationen alle mit unterschiedlicher Aktivität von der NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase reduziert werden. Diese Unterschiede scheinen jedoch mit der Bildung bzw. Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes nicht zusammenzuhängen, denn alle vier Kombinationen besitzen die gleiche scheinbare K_m von $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (Abb.10). Es muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob die unterschiedlichen Oxydationsgeschwindigkeiten durch verschiedene Komproportionierungsgeschwindigkeiten bei der Bildung der jeweiligen Semidehydroascorbinsäure verursacht werden.

Die Aktivitäten für die vier Kombinationen im Komproportionierungsgemisch stehen in einem bestimmten Verhältnis zueinander (Tab. 11b). Die Umsatzgeschwindigkeiten nehmen in folgender Reihenfolge zu: $i\text{-AsH}_2/\text{As}$, AsH_2/As , $i\text{-AsH}_2/i\text{-As}$, $\text{AsH}_2/i\text{-As}$. Diese Reihenfolge ist immer gewahrt. Die Aktivität des natürlich vorkommenden Radikals wird sowohl von $i\text{-AsH}^{\bullet}$ als auch von einem aus AsH_2 und $i\text{-As}$ gebildeten Radikal übertroffen. Für das Radikal aus $i\text{-AsH}_2$ und As findet sich eine fünf mal niedrigere Aktivität als für $\text{AsH}^{\bullet}$. Ein derartiges Radikal ($i\text{-AsH}_2/\text{As}$) müßte bei den tierexperimentellen Unter-

suchungen zur antiskorbutischen Wirksamkeit der I-AsH₂ aus der zugeführten i-AsH₂ und der im Organismus vorhandenen As intermediär entstehen.

Die antiskorbutische Wirksamkeit der i-AsH₂ wird mit 5% derjenigen der AsH₂ angegeben (41), was durch die schnelle Ausscheidung der i-AsH₂ erklärt wird (42, 43). In wie weit daneben auch die niedrige Aktivität des untersuchten Enzyms für das Radikal aus i-AsH₂ und As für die geringe antiskorbutische Wirksamkeit der i-AsH₂ verantwortlich ist, bleibt offen.

5. Zusammenfassung

Um nähere Aussagen über die Stereospezifität der mikrosomalen NADH:Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase machen zu können, wird i-AsH[•], ein Diastereomeres zur AsH[•], als Substrat dieses Enzymsystems eingesetzt. Die i-AsH[•] entsteht in einer Komproportionierungsreaktion aus i-AsH₂ und i-As in gleicher Weise, wie dies für die AsH[•] früher beschrieben wurde.

Die enzymkinetischen Daten für das Substrat i-AsH[•] sind weitgehend identisch mit denen für das physiologische Substrat AsH[•]. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei pH 7,4. Die Proteinabhängigkeit ist in dem Bereich von 0,35 bis 1,75mg Protein pro ml linear. Das Temperaturoptimum liegt etwa bei 38°. Die Michaelis-Konstante beträgt $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ für die i-AsH[•] und $6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ für NADH.

Die Reaktionsprodukte i-AsH₂ und NAD⁺ werden quantitativ bestimmt. Die dabei angewandten Methoden werden beschrieben.

Die Reaktion ist sowohl durch die Inhibitoren PCMB und Monojodessigsäure als auch durch Mg-Ionen hemmbar. Mn-Ionen beeinflussen die Reaktion nicht. NAD⁺-Zusätze bewirken bei den üblichen Substratkonzentrationen eine Verminderung der Aktivität.

Die Enzymaktivität für Radikale, die aus einem Komproportionierungsgemisch mit zwei diastereomeren Partnern entstehen, wird ebenfalls bestimmt und mit der für AsH[•] und i-AsH[•] verglichen. Man erhält für alle vier Kombinationen verschiedene Aktivitäten, die in folgendem Verhältnis stehen:

$$\text{AsH}_2/\text{As} : \text{i-AsH}_2/\text{i-As} : \text{AsH}_2/\text{i-As} : \text{i-AsH}_2/\text{As} = \\ 1 : 1, 2 : 2, 3 : 0,5$$

Es ist bemerkenswert, daß für das Radikal aus AsH₂ und i-As eine mehr als doppelt so hohe Aktivität und für i-AsH[•] eine um Faktor 1,2 größere Aktivität als für AsH[•] gefunden wird.

Eine Stereospezifität der NADH: Semidehydroascorbat-Oxydoreduktase besteht demnach zumindest bezüglich der sterischen Konfiguration an C₅ des Ascorbinsäuremoleküls nicht.

6. Literatur

- 1 HOLST, A. und F. FRÖHLICH, Norsk Mag. Laegevidensk 68, 721(1907)
- 2 HIRST, E.L., E.G.V. PERCIVAL, and F.SMITH, Nature 131, 617(1933)
- 3 HERBERT, R.A., E.G.V. PERCIVAL, R.J.W. REYNOLDS, F.SMITH, and E.L. HIRST, J.Soc.Chem.Ind. 52, 221(1933)
- 4 HERBERT, R.A., E.G.V. PERCIVAL, R.J.W. REYNOLDS, and F.SMITH, J.Chem.soc (London) 1953, 1270
- 5 KARRER, R., K. SCHOOP, and F. ZEHENDER, Helv.chim. Acta 16, 1161(1933)
- 6 MICHEEL, F., Dissertation (Berlin 1933)
- 7 REICHSTEIN, T., A. GRÜSSNER und R.OPPENHAUER, Helv. chim.Acta 16, 561(1933)
- 8 HAWORTH, W.N., und E.L. HIRST, J.Soc.chem.Ind. 52, 645(1933)
- 9 AULT, R.G., D.K. BAIRD, A.C. CARRINGTON, W.N. HAWORTH R.W.HERBERT, E.L. HIRST, E.G.V. PERCIVAL, F. SMITH, and M. STACEY, J.chem.Soc(London) 1933, 1419
- 10 DYLLICK, H., Med.Welt 18, 1089(1967)
- 11 DYLLICK, H., Münch.med.Wschr.109, 2393(1967)
- 12 GLAZEBROOK, A.J., S.THOMSON, J.Hyg.42, 1(1942)
- 13 TEBROCK, H.E., J.J. ARMINO, J.H. JOHNSTON, J.Amer. Med.Ass. 162, 1227(1956)
- 14 WALKER, G.H., M.L.BYNOE, and D.A.J. TYRELL, Brit.Med.J. 603(1967)
- 15 DEGKWITZ, E., W. SCHNEIDER und HJ.STAUDINGER, Wissenschaftl.Veröff.Deut.Ges.Ernährung 14, 17(1965)
- 16 SCHNEIDER, W. und HJ. STAUDINGER, Klin.Wochenschr.42 879(1964)

- 17 BURNS, J.J., in D.M. GREENBERG (Herausgeber), *Metabolic Pathways*, 3. Ausgabe, Bd.I, Acad.Press (New York und London), 394(1967)
- 18 SEBRELL, W.H., and R.A.HARRIS (Herausgeber), *The Vitamins*, 2. Ausgabe, Bd.I, Acad.Press (New York und London), 305(1967)
- 19 KERSTEN, W., H. SCHMIDT und H.J. STAUDINGER, *Biochem. Z.* 326, 469(1955)
- 20 KERSTEN, H., W.KERSTEN und H.J.STAUDINGER, *Biochem.Z.* 328, 24(1956)
- 21 KERSTEN, H., W. KERSTEN und H.J.STAUDINGER, *Biochem. biophysica Acta* (Amsterdam) 27, 598(1958)
- 22 YAMAZAKI, I. und L. PIETTE, *Biochim.biophysica Acta* (Amsterdam) 50, 62(1961)
- 23 YAMAZAKI, I, *biol.Chemistry* 237, 224(1962)
- 24 SCHNEIDER, W., H.J. STAUDINGER und W. WEIS, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 74, 547(1963)
- 25 v.FOERSTER, G., W. WEIS und H.J. STAUDINGER, *Liebigs Annalen d.Chemie* 690, 166(1965)
- 26 SCHNEIDER, W. und H.J. STAUDINGER, *Biochim.biophysica Acta* (Amsterdam) 96, 157(1965)
- 27 LUMPER, L., W. SCHNEIDER und H.J.STAUDINGER, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*348, 323(1967)
- 28 NAZEMI, M., *Dissertation* (Gießen 1967)
29. NAZEMI,M. und H.J. STAUDINGER, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 349, 345(1968)
- 30 v.FOERSTER, G., W. WEIS und H.J. STAUDINGER, *unveröff.Ergebnisse*
- 31 LUMPER, L., W. SCHNEIDER und H.J. STAUDINGER, *unveröff. Ergebnisse*
- 32 STAUDINGER, H.J. und W. WEIS, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.*337, 284(1964)

- 33 OEHLER, G., W. WEIS und H.J.STAUDINGER, in Vorbereitung
- 34 SCHNEIDER, W.C., J. biol.Chemistry 176, 259(1948)
- 35 POTTER, V.A., and C.A. ELVEHJEM, J. biol.Chemistry 114, 495(1936)
- 36 BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th.BÜCHER, R. CZOK, K. H.GARBADE, E.MEYER-ARENDT und G.PFEIDERER, Z. Naturforsch.86, 555(1953)
- 37 KLINGENBERG, M., in "Methoden der enzymatischen Analyse" Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.(1962), Herausgeber H.U.Bergmeyer, S. 528
- 38 ROE, J.H., in Methods of Biochem.Anal., Vol.1, Interscience Publishers, New York und London, Second Printing (1957), S.115
- 39 EVELYN, K.A., H.T. MALLOY, and C. ROSEN, J.biol. Chemistry 126, 645(1938)
- 40 LINEWEAVER, H., and D.BURK, J.Amer.chem.Soc. 56, 658(1934)
- 41 SMITH, P., Analogs of Ascorbic Acid. Adv.in Carbohydrate Chemistry 2, 79(1946)
- 42 ROBERTSON, W. van B., Biochem.biophysica Acta (Amsterdam) 74, 137(1963)
- 43 DAYTON, P.G., and J.J.BURNS, J.biol.Chemistry 231, 85(1958)

Herrn Professor Dr. Hj. Staudinger danke ich
herzlich für die Anregung zur Bearbeitung dieses
Themas sowie für die Bereitstellung eines Arbeits-
platzes in seinem Institut.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des
Biochemischen Instituts, insbesondere Herrn Dr. Weis
für zahlreiche Ratschläge bei der Durchführung der
Arbeit.

Lebenslauf

Ich wurde am 13. November 1944 als Sohn des städt. Beamten Alfred Oehler und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Stroh in Alsfeld (Oberhessen) geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule trat ich im Frühjahr 1955 in die Herderschule Gießen (Gymnasium für Jungen) ein. An dieser Schule legte ich am 20. Februar 1964 die Reifeprüfung ab. In der Oberstufe gehörte ich dem mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig an.

Vom April 1964 bis April 1965 leistete ich den Wehrdienst bei einer Sanitätseinheit der Bundeswehr.

Seit dem Sommersemester 1965 bin ich an der Medizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen immatrikuliert. Im April 1966 bestand ich die naturwissenschaftliche und im Oktober 1967 die ärztliche Vorprüfung. Ich beabsichtige im Wintersemester 1970/71 das medizinische Staatsexamen abzulegen.

Seit Januar 1968 bin ich mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation beschäftigt.

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449